

## **BORO: DETERMINACION DE SU CONTENIDO EN SUELOS Y EN PLANTAS UTILIZANDO AZOMETINA-H**

Silvia Ratto de Miguez; Zulema M. de Sesé e I. Mizuno (1)

*Recibido: 23/1/85*

*Aceptado: 25/11/85*

### **RESUMEN**

Se proponen dos métodos alternativos de extracción de boro en suelos y uno de digestión ácida para vegetales, utilizando en todos los casos para la determinación colorimétrica la azometina-H.

Se lleva a cabo un ensayo de invernáculo usando cinco de los suelos analizados y se comparan los valores de boro en suelo con la producción de materia seca y cantidad de boro extraído por el vegetal.

## **BORON: DETERMINATION OF ITS CONTENT IN SOILS AND PLANTS USING AZOMETHINE-H METHOD**

### **SUMMARY**

Two alternative methods for extracting soil boron, and one acid digestion for plants are presented. In all cases a colorimetric determination is made using azomethine-H.

In a greenhouse experiment, using five different soils, soil boron is correlated with dry matter production and boron content in plants.

### **INTRODUCCION**

Con la finalidad de efectuar un aporte al estudio de la relación suelo-planta con respecto al boro, se trabajó en la búsqueda de una metodología analítica para su determinación en suelos y en plantas que resultase práctica, sensible y económica. El estudio del tema permitirá cubrir deficiencias en las

zonas en que se detectasen y evaluar los excesos del micronutriente en otras regiones del país. Se proponen dos métodos de extracción para suelos y una digestión ácida para vegetales, utilizando en todos los casos la azometina como reactivo colorimétrico.

Numerosos métodos analíticos han sido desarrollados para la determinación de boro en suelos y en plantas. En los últimos años, el común denominador de todos ellos es la

---

1) Cátedra de Edafología, Departamento de Suelos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

utilización de la azometina como reactivo colorimétrico. La reacción se produce en medio acuoso, es sensible y susceptible de sufrir interferencias de los iones Fe, Al, Cu (Basson *et al.*, 1969; Wolf, 1974) y de F (Gestring y Soltanpour, 1981).

Wolf (1971, 1974) adaptó la reacción colorimétrica al estudio de suelos, aguas y vegetales. Para la extracción en suelos utilizó la solución Morgan, sin especificar la existencia de alguna correlación entre su accionar y la absorción vegetal. Todos los extractos se clarificaron por adición de carbón activado y la turbidez se eliminó por centrifugación. Gupta (1979) estudió especialmente la influencia del carbón activado Darco G-60 en la clarificación de los extractos. De acuerdo con sus experiencias, realizadas en suelos podzólicos, la adición del carbón puede resultar en menores valores de absorbancia por la adsorción de parte del boro en solución sobre su superficie. Parker y Gardner (1981), estudiaron la extracción con agua, agua más carbón y con cloruro de calcio 0,02M, encontrando muy baja la efectividad del carbón para la clarificación de los extractos y lo atribuyeron al mayor contenido de arcillas de los suelos trabajados que los utilizados por Gupta. Con la solución salina, en cambio, lograron extractos límpidos y los datos finales obtenidos fueron muy similares a los que resultaron de la extracción con agua, que es el extractante más aceptado y difundido. El tiempo de ebullición en la extracción ha sido otra variable considerada por varios investigadores. Se ha trabajado con cinco, diez, quince y veinte minutos (Berger y Troug, 1944; Gupta, 1967). Odom (1980), retomó el tema y consideró óptimo, para los suelos con los que trabajó, un lapso de diez minutos.

Con estos antecedentes, quedaba pues planteado el problema de lograr, para la variada gama de suelos de la Argentina, una metodología que se pudiese adaptar a diferencias texturales, cantidad y calidad de materia orgánica y que reflejase lo más fielmente posible el dato buscado.

En la referente a vegetales, Williams y Vlamis (1960), estimaron el error que se podía producir por contaminación cuando se efectuaba una digestión de material vegetal en un horno de mufla. Havlin y Soltanpour (1980) propugnaron la utilización de la digestión por la vía húmeda con ácido nítrico. Gestring y Soltanpour (1981 a) analizaron el grado de contaminación que, en el sistema anteriormente citado, producía la utilización de tubos pyrex, y propusieron sustituirlos por envases de nalgene inmersos en baño maría a temperatura regulada. Este procedimiento resultaba sencillo, no producía el error anteriormente citado, permitía prescindir de la mufla y trabajar con mayor número de muestras por vez. Posteriormente, estos mismos investigadores (1981 b), compararon las lecturas obtenidas por vía colorimétrica con azometina y con la utilización de la técnica del ICP-AES (emisión del plasma) para extractos de plantas obtenidos en horno de mufla y por ataque ácido. Los extractos de planta obtenidos por ataque ácido no se pudieron analizar por la vía colorimétrica por la interferencia provocada por la intensa coloración amarillenta que presentaban y los otros, obtenidos por combustión, dieron lecturas casi idénticas por ambos sistemas de análisis.

Dadas las ventajas enunciadas para la digestión ácida y la imposibilidad de trabajar con un instrumental tan sofisticado como el que se requiere para la aplicación del ICP-AES, se efectuó la búsqueda de una adaptación que permitiese combinar la primera con la reacción colorimétrica que utiliza azometina.

## MATERIALES Y METODOS

### Suelos

Las muestras estudiadas corresponden a horizontes superficiales de distintas zonas del país (Cuadro 1).

CUADRO 1: Características de las muestras estudiadas.

Muestra Nº	Provincia	Localidad	Clasificación taxonómica	Textura	pH (1)	C <sub>t</sub> (2)
1	Misiones	Santa Cecilia 1 Candelaria	Udult s. Urunday	franco arenoso	4,7	0,71
2	Misiones	Santa Cecilia 2 Candelaria	Udult s. Posadas	franco	4,9	1,6
3	Misiones	Cerro Azul Cerro Azul	Udult s. Cerro Azul	franco arcillo arenoso	5,5	1,56
4	Misiones	Carlos Navaja Candelaria	Udult s. Urunday	franco arenoso	4,8	0,46
5	Misiones	Alem Alem	Udult s. Puerto Piray	franco arcilloso	5,5	2,08
6	Corrientes	Rincón Chico Virasoro	Udult flia. Timbauva	franco arcillo arenoso	5,1	2,03
7	Corrientes	Paso de los Libres	Aqualf	franco arcilloso	6,3	0,68
8	Entre Ríos	Concordia	Fluvent	arenoso a areno franco	6,1	0,21
9	Entre Ríos	La Paz	Peludert	franco arcillo limoso	8,1	2,3
10	Buenos Aires	Santa Ana 1 Rojas	Argiudol típico s. Rojas	franco limoso	6,3	2,78
11	Buenos Aires	Santa Ana 2 Rojas	Argiudol típico s. Rojas	franco limoso	6,3	2,30
12	Buenos Aires	El Salto Salto	Argiudol típico s. Arroyo Dulce	franco limoso	5,8	2,0
13	Santa Fe	Santa Juana Teodelina	Argiudol típico s. Delgado	franco	5,9	2,2
14	Buenos Aires	Gral. Belgrano	Hapludol tapto argílico s. Udaondo	franco limoso grueso	6,3	1,7
15	Buenos Aires	Luján	Argialbol ácuico s. Navarro	franco limoso	5,9	2,03
16	Buenos Aires	Azul	Argiudol típico s. Mar del Plata	franco	5,8	3,42
17	Buenos Aires	La Margarita Pehuajó	Hapludol s. Rivadavia	franco arenoso	6,3	1,56
18	La Rioja	El Condado	Torriorthent típico	franco arcilloso	8,7	0,21
19	La Rioja	Villa Unión	Torriorthent típico	franco arcilloso	8,8	0,05
20	La Rioja	Villa Unión	Torriorthent típico	franco arcilloso	8,8	0,26

(1) pH en agua 1:2,5

(2) Carbono total: método de Walkley-Black modificado por Richter *et al.*, 1973.

## Vegetales

Para el estudio del método se utilizaron muestras provenientes de una pastura natural y para el ensayo de invernáculo las plántulas obtenidas del cultivo de semillas de *Helianthus annuus* (girasol) Cargill S 400, seleccionadas por peso y por tamaño.

### Extracción de boro en suelos

Se efectuó con la utilización del agua a ebullición y con cloruro de calcio 0,02 M, introduciendo en cada caso algunas modificaciones.

#### a) Agua a ebullición

De acuerdo con lo descripto por Gupta (1967, 1979), se colocaron en un vaso de precipitación de vidrio Pyrex de 100 ml de capacidad, 25 g de suelo, 50 ml de agua desionizada y una cantidad de carbón Darco-G 60 que se fijó experimentalmente y que fue variable de acuerdo al contenido de materia orgánica de la muestra. Se mantuvo a ebullición durante diez minutos. A continuación, controlando por pesada, se repuso el agua evaporada e inmediatamente se centrifugó en una centrífuga MSE 18 a 13.500 rpm durante treinta minutos. Simultáneamente se preparó un ensayo en blanco. En el sobrenadante se realizó la determinación del contenido de boro por colorimetría con azometina-H.

#### b) Cloruro de calcio 0,02M

Se efectuó con la técnica descripta por Ratto de Miguez *et al.* (1984), pesando 0,6 g de carbón para la clarificación de todos los extractos. Se realizó un estudio en distintos lapsos de ebullición que variaron entre cinco y veinte minutos para un suelo con bajo contenido de materia orgánica y otro de alto contenido.

### Recuperación de boro en extractos obtenidos con cloruro de calcio 0,02M

Se estudió en el suelo número 11 con un contenido de materia orgánica de 4,6 por ciento, siguiendo el esquema experimental usado para un suelo con bajo contenido de materia orgánica por Ratto de Miguez *et al.* (1984).

### Extracción de boro en vegetales

En un frasco de boca ancha de polietileno de alta densidad se colocó 1 g de material vegetal triturado y se lo mantuvo en contacto durante una noche con 10 ml de ácido nítrico concentrado. Luego se lo llevó a baño maría a 90°C hasta obtener el ataque total del material, operación que se prolongó, en algunos casos, hasta seis horas. El residuo de sílice se suspendió en 30 ml de agua desionizada por agitación durante un minuto. A continuación se lo filtró al vacío por papel Whatman 42, luego de lo cual se realizó un lavado del residuo que hubiera podido quedar en el recipiente plástico con 20 ml de agua desionizada, fracción que filtrada se incorporó a la anterior. Todos los extractos obtenidos presentaron color amarillo intenso. Se los agitó con 1,5 g de carbón Darco G-60 y se los filtró nuevamente al vacío. En forma similar y simultáneamente se preparó un ensayo en blanco.

### Recuperación de boro en extractos vegetales

Para conocer la influencia del carbón y las posibles pérdidas en la etapa de la digestión, se llevó a cabo una recuperación de boro en la siguiente forma: se procesaron simultáneamente seis muestras de un mismo vegetal. A las números 1 y 2 se les aplicó el procedimiento empleado para vegetales. A

las números 3 y 4 se les incorporó en el momento de iniciar el ataque con ácido nítrico 100  $\mu\text{g}$  de boro y a las números 5 y 6 les fue incorporada esta misma cantidad del micronutrimiento luego de decolorar el extracto con el carbón. Posteriormente se les agregó nuevamente carbón y se filtró.

Los envases utilizados se descartaron después de dos digestiones.

### Colorimetría

#### a) Suelos

Se siguieron las indicaciones de Ratto de Miguez *et al.* (1984), preparando la curva testigo, en cada caso, con el extractante correspondiente.

#### b) Vegetales

Se realizó sobre 5 ml del extracto final con cantidades de buffer, EDTA y azometina iguales a las usadas para suelos, acompañados por una curva testigo preparada con 5 ml de blanco y con cantidades de boro que oscilaron entre 2 y 15  $\mu\text{g}$ .

### Ensayo biológico

Para este ensayo se emplearon los suelos números 2, 4, 5, 9 y 11 del Cuadro 1. El diseño aplicado fue de bloques al azar. El tratamiento consistió en el agregado a los recipientes de una dosis de solución completa menos boro, con cinco repeticiones por suelo, y el testigo recibió idéntica dosis pero de solución completa, con dos repeticiones. Las macetas utilizadas consistieron en vasos plásticos de 180 ml de capacidad, con 25 g de suelo, cantidad similar a la usada para la extracción de boro. En la parte inferior y superior se colocó perlita proveniente de lava de volcán lavada con ácido clorhídrico diluido y agua deionizada hasta reacción negativa de boro. El riego se efectuó una o dos veces al día, teniendo en cuenta la humedad equivalente del suelo.

Para la germinación, las semillas usadas fueron colocadas sobre trozos de algodón estéril humedecido con agua desionizada y al tercer día se efectuó su trasplante colocando una semilla por maceta. A la semana se les incorporó la solución nutritiva. A los treinta y cinco días se realizó la cosecha de las plántulas. A cada una de ellas se la lavó con agua desionizada y se efectuó un corte a la altura del cuello, separando la parte aérea para su posterior análisis. El secado se realizó a 80°C por espacio de 48 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Una de las dificultades que se debe sortear cuando se desea ajustar el método para el estudio de suelos, es la que resulta del desarrollo de la reacción colorimétrica en extractos coloreados o con partículas orgánicas e inorgánicas en suspensión que conducen a errores por exceso. De las experiencias realizadas para la clarificación de los extractos con el uso del carbón, puede verificarse que es importante no sólo la cantidad sino también la calidad de la materia orgánica. Suelos "rojos" requirieron a igual cantidad de materia orgánica menor cantidad de carbón que otros "oscuros", para ser clarificados (Cuadro 2).

**CUADRO 2:** Cantidad de carbón Darco G-60 utilizado para obtener la clarificación de los extractos de suelo con agua a ebullición y posterior centrifugación.

Materia orgánica %	Carbón g
< 3	0,2
3-4	0,4
> 4	0,6 suelos "rojos"
> 4	0,8 suelos "oscuros"

Es de hacer notar que a veces los extractos resultan límpidos a simple vista pero su lectura contra el blanco puede dar valores ta-

les que resultan en un valor mayor de absorbancia de la muestra cuando se le agrega la azometina.

La aplicación de la centrifugación a 13.500 rpm en muy pocas muestras clarificó suficientemente el extracto, pero permitió disminuir las cantidades de carbón a agregar.

Los extractos obtenidos con la incorporación de la cantidad de carbón estipulada y posterior centrifugación, resultaron aptos para la lectura y no necesitaron filtración.

El uso de cloruro de calcio 0,02M como extractante de suelos de alto contenido de materia orgánica, limos y arcillas, permitió obtener extractos límpidos pero no lo suficiente. Se hizo necesario entonces insistir en la posibilidad del uso del carbón. En los trabajos anteriormente citados se lo introduce en la etapa de ebullición. Para evitar el contacto prolongado del carbón con el suelo, se lo agregó una vez obtenido el extracto, lográndose muy buenos porcentajes de recuperación (Cuadro 3) (Ratto de Miguez *et al.*, 1984).

**CUADRO 3: Recuperación de boro en un extracto obtenido con cloruro de calcio 0,02M en un suelo con alto contenido de materia orgánica. Muestra N° 11 con 4,6 por ciento M.O.**

B incorporado µg	Recuperación %
100	110
200	96

De esta manera el método se simplifica ya que no se necesita utilizar la centrifugación, se estandariza la cantidad de carbón a agregar independientemente de la de materia orgánica del suelo y se obtienen valores muy similares en términos absolutos a los logrados con agua a ebullición como extractante (Cuadro 4).

El uso de distintos lapsos de ebullición arrojó tendencias diferentes, dando el máximo valor para el suelo rico en materia orgánica a los diez minutos y para el pobre en quince (Cuadro 5). En ambos casos a los

**CUADRO 4: Contenido de boro en suelos.**

Muestra N°	(1)	B ppm	(2)
1	0,40		0,50
2	0,52		0,60
3	1,12		1,04
4	0,18		0,20
5	0,55		0,58
6	0,54		0,60
7	0,41		0,40
8	0,16		0,20
9	1,21		1,20
10	0,93		0,63
11	0,70		0,55
12	0,90		0,95
13	0,90		1,00
14	0,91		0,99
15	1,25		1,18
16	1,52		1,55
17	0,96		0,91
18	2,10		2,12
19	0,86		0,80
20	2,59		2,59

(1) Agua a ebullición.

(2) Cloruro de calcio 0,02M.

$r = 0,98$  \*\*\*

significativo al 0,1 por ciento.

**CUADRO 5: Influencia del tiempo de extracción de boro con  $\text{CaCl}_2$  0,02M en un suelo de bajo contenido de materia orgánica y en otro de alto.**

Tiempo de extracción (minutos)	Boro ppm			
	(1)	CV	(2)	CV
5	0,82	10	0,56	0
10	0,80	0	0,58	4
15	0,96	0	0,56	0
20	0,80	0	0,54	0

(1) Muestra N° 19 con 0,1 por ciento M.O.

(2) Muestra N° 11 con 4,6 por ciento M.O.

CV: Coeficiente de variación porcentual.

**CUADRO 6: Recuperación de boro de una muestra vegetal proveniente de una pastura natural.**

Fracción Nº	B incorporado	B medido			Recuperación
	µg	A µg	B µg	C µg	%
1	—	0,78	—	—	—
2	—	0,79	—	—	—
3	100		2,51	1,72	88
4	100				
5	100		2,73	1,95	97
6	100				

A: valor de 1 ml de extracto vegetal.

B: valor de 1 ml de extracto vegetal con incorporación de B.

C: valor resultante de B-A.

veinte minutos disminuye y esto coincide con las experiencias de Berger y Troug (1944), utilizando agua como extractante. También se está de acuerdo con Gupta (1967) en el aumento de la cantidad de boro extraída entre cinco y diez minutos para el suelo rico en materia orgánica.

En la digestión de los vegetales se optó por el ataque ácido en razón de las ventajas

enunciadas. Las interferencias de los compuestos nitrogenados con la reacción colorimétrica se eliminaron con la incorporación del carbón activado como lo demuestran los datos del Cuadro 6.

En el Cuadro 7 se detallan los resultados del ensayo de invernáculo, en tanto que el estudio de correlación de los principales parámetros figuran en el Cuadro 8.

**CUADRO 7: Resultados obtenidos en el ensayo de invernáculo.**

Suelo Nº	Materia seca g		µg Boro absorbido 25 g de suelo	
	(1)	(2)	(1)	(2)
2	1,1048	1,2699	82,36	90,85
4	1,1914	1,1380	88,18	75,68
5	1,2727	1,3142	86,86	92,43
9	1,4366	1,4443	94,18	110,50
11	1,3316	1,4952	102,83	135,17

(1) Tratamiento.  
(2) Testigo.



CUADRO 8. Valores de los coeficientes de correlación entre los parámetros analizados.

Boro ppm	Ct %	pH	Materia seca g	ug B absorbido 25 g de suelo
	(1)	(2)	(3)	(3)
Agua a ebullición	0,79 **	0,68 **	0,80	0,44
Cloruro de calcio 0,02M	0,73 **	0,65 **	0,69	0,22

(1) 17 suelos.  
 (2) 20 suelos.  
 (3) 5 suelos.  
 \*\* significativo al 1 por ciento.

De la observación de estos dos últimos cuadros puede deducirse una asociación positiva entre el porcentaje de carbono total de los suelos y el boro extraído de los mismos. Si se excluyen las tres muestras pertenecientes a los suelos de La Rioja, en donde se presume un enriquecimiento artificial por agua de riego (Ratto de Miguez *et al.*, 1984), los valores del coeficiente de correlación resultan significativos al 1 por ciento.

Con el pH la asociación es menos pronunciada y aumenta cuando se consideran los veinte suelos estudiados.

Entre el contenido de boro determinado con agua a ebullición y la producción de materia seca se obtiene un coeficiente  $r = 0,80$  ( $p = 0,10$ ).

Si se consideran los valores obtenidos con cloruro de calcio 0,02M, el valor desciende a  $r = 0,69$  ( $p = 0,20$ ). No hubo correlación entre el boro extraído por la planta en los 25 g de suelo y el determinado por los métodos analíticos. Las mayores diferencias entre el tratamiento y el testigo se produjeron en los suelos números 2, 5 y 9, que tienen valores de boro cercanos al nivel crítico para deficiencias de acuerdo con la bibliografía, sin que llegasen a ser significativos al 5 por ciento de probabilidad. La ausencia de síntomas de deficiencias en el suelo número 4 durante los treinta y cinco días del ensa-

yo, permite pensar en una falta de sensibilidad de la metodología empleada en el invernáculo o en la necesidad de una revisión más profunda de la acción de los extractantes usados. Hubo diferencia estadísticamente significativa al 5 por ciento de probabilidad entre la materia seca producida por el suelo número 2 y el número 9.

## CONCLUSIONES

- 1) Con respecto a suelos, los resultados evidencian que ambos extractantes pueden emplearse teniendo en cuenta las modificaciones introducidas en cada caso.
- 2) Por la mayor simplicidad, para análisis de rutina se recomienda la utilización de cloruro de calcio 0,02M, con diez minutos de extracción.
- 3) El método utilizado para vegetales resulta relativamente sencillo, permite trabajar con varias muestras por vez y brindó un buen porcentaje de recuperación.
- 4) El ensayo de invernáculo deja planteados algunos interrogantes como la sensibilidad de los extractantes y la necesidad de trabajar más con aquellos suelos que presentan valores cercanos a los considerados críticos.



## AGRADECIMIENTOS

La utilización de la centrífuga MSE 18 fue posible gracias a la colaboración de la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Basson, W. D.; R. G. Böhmer and D. A. Stanton, 1969. An automatic procedure for the determination of boron in plant tissue. *Analyst* 94: 1135-1141.
- 2) Berger, K. C. and E. Truog, 1944. Boron test and determination for soils and plants. *Soil Sci.* 57: 25-36.
- 3) Gestring, W. D. and P. N. Soltanpour, 1981 a. Evaluation of wet and dry digestion methods for boron determination in plant samples by ICP-AES. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.* 12 (8): 743-753.
- 4) Gestring, W. D. and P. N. Soltanpour, 1981 b. Boron analysis in soil extracts and plant tissue by plasma emission spectroscopy. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.* 12 (8): 733-742.
- 5) Gupta, U. C., 1967. A simplified method for determining hot-water soluble boron in podzol soils. *Soil Sci.* 103: 424-428.
- 6) Gupta, U. C., 1979. Some factors affecting the determination of hot water soluble boron from podzol soils using azomethine-H. *Can. J. Soil Sci.* 59: 241-247.
- 7) Havlin, J. L. and P. N. Soltanpour, 1980. A nitric acid plant tissue digest method for use with inductively Coupled Plasma Spectrometry. *Commun. in Soil Sci. and Plant Analysis.* 11 (10): 969-980.
- 8) Odom, J. W., 1980. Kinetics of the hot water soluble boron test. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.* 11: 759-765.
- 9) Parker, D. R. and E. H. Gardner, 1981. The determination of hot water soluble boron in some acid Oregon soils using a modified azomethine-H procedure. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.* 12 (12): 1311-1322.
- 10) Ratto de Miguez, S. Z. de Sesé; H. Canelo e I. Mizuno, 1984. Estudio del contenido de boro en suelos y aguas de la provincia de La Rioja mediante el uso de azometina-H. *Ciencia del Suelo* 2 (1): 37-43.
- 11) Willimas, D. E. and J. Vlamis, 1960. Boron analysis of plant tissue. *Soil Sci.* 92: 161-165.
- 12) Wolf, B., 1971. The determination of boron in soil extracts, plant materials, composts, manures, water and nutrient solution. *Soil Sci. Plant Anal.* 2: 363-374.
- 13) Wolf, B., 1974. Improvements in the azomethine-H method for the determination of boron. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 5: 39-44.